ChinaXiv合作期刊

新型磷镁晶须的体外生物相容性和抗菌性能*

赵 冰[1,2,4,5] 徐大可[3] 孙子晴[3] 任伊宾[3]
战德松[1,2,4,5] 肖克沈[3] 杨 柯[3]

1. 中国医科大学附属口腔医学院材料教研室 沈阳 110002
2. 辽宁省口腔医院研究所 沈阳 110002
3. 中国科学院金属研究所 沈阳 110016
4. 辽宁省口腔疾病重点实验室 沈阳 110002
5. 辽宁省口腔疾病转化医学研究中心 沈阳 110002

摘 要 采用RTCA法和Annexin-V/PI双标记法研究了一种新型磷镁晶须的体外生物相容性，采用共培养法研究了抗菌性能。结果表明，磷镁晶须材料的生物相容性随着晶须浓度的提高而降低，晶须浓度小于等于500 μg/mL时具有较好的体外生物相容性。当晶须浓度为50 μg/mL和200 μg/mL时，对成骨细胞几乎没有影响。磷镁晶须的杀菌效能随着浓度的提高而提高，浓度为500 μg/mL时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌率分别达到96.84%和99.93%，表现出优异的抗菌性能。

关键词 无机非金属材料，磷镁晶须，生物相容性，抗菌性能，细胞凋亡，RTCA

分类号 TB321 文章编号 1005-3093(2016)03-0220-09

In Vitro Biocompatibility and Antibacterial Property of a Novel Magnesium Phosphate Whisker

ZHAO Bing[1,2,4,5] XU Dake[3] SUN Ziqing[3] REN Yibin[3] ZHAN Desong[1,2,4,5**]
XIAO Keshen[3**] YANG Ke[3]

1. Department of Dental Material, School of Stomatology, China Medical University, Shenyang 110002, China
2. Liaoning Institute of Dental Research, Shenyang 110002, China
3. Institute of Metal Research, Chinese Academic of Sciences, Shenyang 110016, China
4. Liaoning Province Oral Diseases Key Laboratory, Shenyang 110002, China
5. Liaoning Province Oral Diseases Translation Medcicne Research Center, Shenyang 110002, China

*Supported by Shenyang Science and Technology Project No. F16-206-9-14.
Manuscript received November 17, 2015; in revised form December 28, 2015.
**To whom correspondence should be addressed, Tel: (024)22891863, E-mail: zhandesong@126.com.

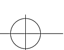
ABSTRACT The in vitro biocompatibility of a novel magnesium phosphate whisker (M-PW) was evaluated by real-time cellular analysis (RTCA) and Annexin-V/PI double marking methods, and its antibacterial property was evaluated by co-culture method. Results show that the in vitro biocompatibility of the M-PW decreased with the increase of M-PW in the suspensions. It possessed excellent in vitro biocompatibility for the suspensions containing 500 μg/mL or lower amount of the M-PW. It had no toxic effect on osteoblast cells for the suspension with 50 and 200 μg/mL of M-PW respectively. The antibacterial efficacy of the suspensions increased with the increasing amount of M-PW. The antibacterial efficacy against Escherichia coli and Staphylococcus aureus achieved 96.84% and 99.93% respectively for the suspension with 500 μg/mL of M-PW, demonstrating that the novel phosphorous-magnesium whisker possesses excellent antibacterial property.

KEY WORDS inorganic non-metallic materials, magnesium phosphate whisker, biocompatibility, antibacterial property, apoptosis, RTCA

近年来，晶须作为新型增强填料引起了国内外广泛的关注。晶须是一类由高纯度单晶生长而成的微纳米级纤维状或针状材料，具有近乎一致的横断面和极大的长径比，其极小的直径使晶体内部缺陷

* 沈阳市科技计划F16-206-9-14资助项目。
2015年11月17日收到初稿；2015年12月28日收到修改稿。
本文联系人：战德松，教授
DOI: 10.11901/1005.3093.2015.643

chinaXiv:202303.10704v1



ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10704v1

少。因此, 晶须的强度和模量接近完整晶体材料的理论值, 具有显微增强和充填能力, 现已成为主要的增强补韧材料之一, 用于各种复合材料的制备[1]。目前, 晶须在材料科学、建筑学、化学工程, 以及口腔学和骨外科学等领域均得到了广泛的研究[2, 3]。

在骨缺损修复和再生领域, 由于骨缺损位点存在骨与血管的再生困难以及感染等问题, 一直是整形外科临床工作的难点[4]。在传统上外伤引起的感染, 单纯通过无菌技术是不能完全避免术后感染的[5]。在一定程度上细菌以骨植入材料为生存载体并在其表面形成菌膜, 引发术后感染而减缓愈合过程[6]。生物活性陶瓷是一种理想的骨组织工程材料, 为再生修复骨缺损提供了有效治疗方法[7]。但是, 陶瓷材料的脆性影响了在临床上的应用。很多学者将羟基磷灰石晶须与不同种类的生物活性陶瓷材料复合, 发现晶须不仅增强了复合后生物陶瓷的机械性能, 甚至提高了生物活性[8-11]。

树脂类材料广泛应用于口腔龋损的充填、修复体的粘接、临时修复体的制备以及构成活动义齿的基托等方面, 但是在临床使用中有强度低、耐磨性差、聚合体积收缩较大、易出现微渗漏和继发龋等缺点[12]。理想的口腔材料应具有优良的力学性能和抗菌性能, 以保证其在口腔内的较大咀嚼应力的作用下仍保持良好的形态, 行使正常功能。另一方面, 树脂材料应用于口腔内后会有不同程度的腐蚀, 使病菌更容易粘附在其表面而引发继发龋和牙周、黏膜等感染。晶须改性树脂材料可显著提高材料的强度和弹性模量[13, 14], 且赋予树脂较好的抗菌性能[15]。本文使用中国科学院金属研究所开发的新型磷镁晶须, 研究晶须浓度对成骨细胞的细胞毒性以及其抗菌性能的影响。

1 实验方法

磷镁晶须由无水乙醇清洗后置于60℃恒温箱中3−5 h, 真空条件下喷金120 s, 扫描电镜中观察。

晶须培养液pH值的测定: 将样品称重后用紫外光照40 min灭菌消毒, 再分别用含10%胎牛血清的α-MEM高糖培养基配成50、200、500、1000 μg/mL混悬液。振荡器振荡10 min, 悬液无分层, 呈乳状。将其置于4℃冰箱静置24 h后测量各组晶须混悬液的pH值。

RTCA (Real-time cellular analysis)实时细胞毒性检测: 将处于生长对数期的骨前驱细胞MC3T3-E1接种于RTCA E-Plate View 96孔板中, 150 μL/孔(1×10^3个细胞/每孔), 每板分为晶须50、200、500、1000 μg/mL 4个实验组以及空白对照组。每组设3个副孔, 置于37℃的5% CO_2(体积分数)培养箱中培养20 h后, 吸出孔板中原培养液, 加入配好的α-MEM晶须混悬液。用xCELLigence RTCA DP系统继续连续监测120 h。xCELLigence RTCA DP系统每5 min对E-plate读取一次结果, 数据由RTCA software 2.0控制和采集, 以孔板混悬液加入前(20 h)的数据作为起始的标准化基线CI值, 设定为1[16]。140 h的RTCA检测后结束实验, 对数据进行分析。

Annexin-V/PI双染标记检测细胞凋亡: 将处于生长对数期的骨前驱细胞MC3T3-E1接种于6孔板中, 分为50、200、500、1000 μg/mL 4个实验组以及空白对照组, 1.5 mL/孔(1×10^4个细胞/每孔), 置于37℃、5% CO_2(体积分数)培养箱中培养24 h。待细胞贴壁后弃去原培养液, 加入配好的α-MEM晶须混悬液。继续培养48 h后, 用不含EDTA的0.25%胰蛋白酶消化细胞, 冷PBS重悬后4℃、1000 r/min离心10 min, 重复2次。用200 μL缓冲液重悬细胞, 加入10 μL Annexin V和5 μL PI混匀, 在室温条件下避光反应15 min后再加入300 μL缓冲液, 上机检查。重复3次。

统计学分析: 使用SPSS 22.0 software软件对数据进行统计学处理, 采用One-way ANOVA分析, $P<0.05$为差异具有统计学意义。

共培养法检测抗菌性能: 将预先准备好的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌液稀释成10^8 cfu/mL, 梯度稀释3次至菌液浓度为10^5 cfu/mL。取稀释后的菌液滴加在装有4组磷镁晶须和空白的小离心管中, 分别振荡5 min使其充分溶解(晶须混悬菌液浓度为50、200、500、1000 μg/mL), 然后放入温度为37℃的恒温培养箱中接触培养48 h, 相对湿度为90%。振荡器振荡45 s后分别取出100 μL各组培养48 h后的混悬样液接种于营养琼脂培养基的平板中, 同时测定余留晶须混悬菌液的pH值。将培养皿置于37℃恒温培养箱中培养24 h后进行菌落计数, 重复实验3次, 样品的杀菌率[17]

$$K=\frac{N_{ctrl}-N_{anti}}{N_{ctrl}}\times 100\%$$

其中N_{ctrl}为空白对照组培养皿中的细菌数, N_{anti}为不同浓度磷镁晶须组培养皿中的细菌数。

2 结果和讨论

2.1 磷镁晶须的形貌

实验用磷镁晶须的主要成分为Mg、P以及微量的Na、K、H、O等元素。由图1可见, 晶须的横断面为微纳米尺寸, 纵向长度在200 μm以上, 纵向径比

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10704v1

高于10−100, 具有很大的比表面积和类似针状结构。磷镁晶须的生长机理是液−固机理(L-S机理), 其特点为四步生长模型, 即反应微区的形成、晶核的形成、晶核生长、晶须形成[18]。晶须在结晶时原子结构排列高度有序, 内部几乎无缺陷, 因而其强度接近材料原子间价键理论强度[19]。

2.2 体外细胞毒性

应用于生物体之前, 先要检测新型生物医用材料的体外细胞毒性[20]。xCELLigence RTCA系统是一种基于微电子传感器技术, 实时监测阻抗的变化, 是一种非标记、非侵入性、实时的模拟细胞状态的细胞分析监测系统[21, 22]。根据有无细胞黏附于电极以及细胞的形态, 电场发生改变。无细胞存在时阻抗为最小值, 细胞的存在阻碍磁场而使阻抗增强[21]。该系统将阻抗转化成细胞指数(CI)以表示检测电极处细胞形态和数目的改变。传统的MTT、WST-1、CCK-8等通过与线粒体酶结合改变吸光度而检测细胞毒性[23-25], 属于终止实验。在采集多个时间点时, 往往需要同时做多个复制样本。而RTCA实时监测细胞动态, 避免了各个时间点实验需重复操作的过程。多项研究结果表明, RTCA与传统细胞毒性检测方法MTT等结果相符[26-28]。

由表1可见, 磷镁晶须混悬液的pH值随着晶须

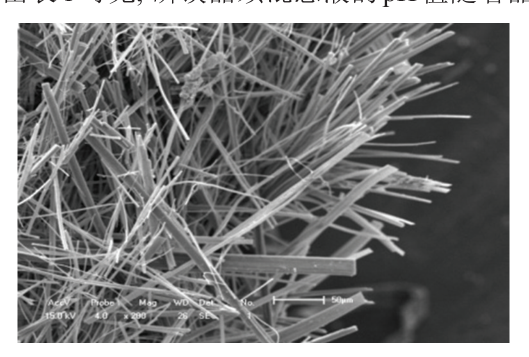


图1 磷镁晶须的扫描电镜照片

Fig.1 SEM micrograph of phosphorus-magnesium whisker

表1 加入MC3T3-E1细胞前各α-MEM晶须液组和空白对照组的pH值 (n=5)

Table 1 pH of the whisker treated groups and blank group in α-MEM medium without addition of MC3T3-E1 cell (n=5)

Groups (μg/mL)	pH
50	7.50±0.18
200	7.95±0.17
500	8.03±0.23
1000	8.15±0.14
Blank	7.44±0.19

浓度的提高而升高, 细胞对照组的pH值最小。其原因是, 材料降解时释放的Mg^{2+}与水发生作用形成氢氧化镁[29], 调控细胞培养基pH为碱性。随着材料浓度的提高降解时培养液中羟基增多, pH值也随之提高。

由图2可见, MC3T3-E1经不同浓度的磷镁晶须混悬液处理24 h后, 50、200、500、1000 μg/mL组标准化细胞指数(NCI, Normalized Cell Index)均显著低于对照组($P<0.05$)。但经不同浓度的晶须混悬液处理48 h($P=0.002<0.05$)、72 h($P=0.006<0.05$)、96 h($P=0.002<0.05$)后, 只有1000 μg/mL组NCI显著低于对照组。120 h后500 μg/mL ($P=0.042<0.05$)和1000 μg/mL ($P=0.002<0.05$)组的NCI均显著低于对照组, 其余组NCI与对照组无统计学差异。其可能的原因是, 晶须混悬液加入细胞中后pH值的突然升高使细胞状态受到一定的影响。但是, 细胞培养箱中5% CO_2的存在使细胞培养液的pH值随着时间的延长而降低, 48 h后浓度≤500 μg/mL的晶须混悬液的pH值已被调整过来, 或细胞已经适应此时的微环境的pH值。研究表明, 在骨内植入材料中添加镁离子可促进新骨的生成[30-31]。Sul等[32]发现, 镁离子涂层含量在8.36%−9.33%范围内成骨性能最好。王健等[33]证实, 镁离子促进骨再生具有浓度依赖性。浓度较高时对成骨细胞的活力和分化有抑制作用, 6−10 mM的镁离子浓度是比较合适的浓度范围。这也可解释了本实验在48、72、96 h时, 500 μg/mL组晶须与空白对照组无显著性差异, 而在120 h时细胞指数却稍低于空白对照组。其原因是, 磷镁晶须材料在降解过程中逐步释放镁离子, 使细胞培养液中镁离子浓度随时间延长逐渐增大, 在120 h时对成骨细胞的增殖有了一定的抑制作用。虽然本文的实验缺少具体离子浓度的分析, 但是可以看出, 随着晶须浓度的提高磷镁晶须对成骨细胞的毒性也有所增强。

将NCI换算成细胞相对增值率(RGR)后进行评级[16], 结果列于表2和表3。可以看出, 1000 μg/mL组在24、48、72 h时毒性评级为3级, 其余各组毒性等级均在2级或2级以上。根据ISO 10993-5规定, 细胞毒性等级超过2级时, 材料具有细胞毒性。因此, 在满足细胞毒性等级的条件下, 当磷镁晶须浓度小于等于500 μg/mL时具有良好的生物相容性。

2.3 细胞凋亡

细胞凋亡是细胞的基本特征之一, 用Annexin-V/PI检测细胞凋亡[25]。

图3中的二维点阵图表明, 正常活细胞Annexin-V和PI均低染, 分布在图的左下象限(LL); 早期凋

ChinaXiv合作期刊

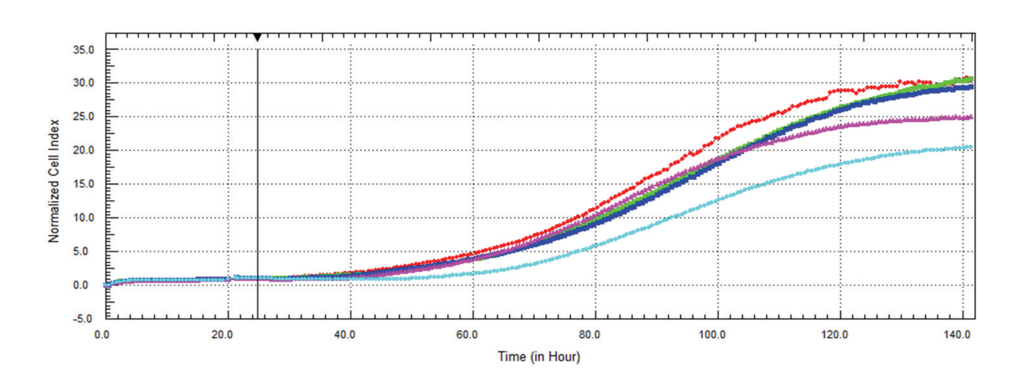


图2 4组不同浓度的磷镁晶须和空白组对MC3T3-E1细胞生长影响的实时细胞分析

Fig.2 Real time cell analysis (RTCA) profiling of the four treated groups of phosphorus-magnesium whisker and the blank group for MC3T3-E1 mouse cells Blank group; 50 μg/mL phosphorus-magnesium whisker; 200 μg/mL phosphorus-magnesium whisker; 500 μg/mL phosphorus-magnesium whisker; 1000 μg/mL phosphorus-magnesium whisker

表2 MC3T3-E1细胞在4组浓度的磷镁晶须作用下的细胞相对增值率

Table 2 Cell relative growth rate (RGR) of MC3T3-E1 cells treated with 4 different concentrations of phosphorus-magnesium whisker

Groups (μg/mL)	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
50	80.65%	84.21%	85.33%	93.75%	102.18%
200	84.67%	83.37%	82.20%	92.09%	98.32%
500	71.70%	91.73%	89.56%	84.97%	83.31%
1000	36.91%	42.18%	56.38%	64.02%	68.43%

表3 4组不同浓度的磷镁晶须对MC3T3-E1细胞毒性等级

Table 3 Cytotoxicity levels of MC3T3-E1 cells treated with 4 different concentrations of phosphorus-magnesium whisker

Groups (μg/mL)	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
50	1	1	1	1	0
200	1	1	1	1	1
500	2	1	1	1	1
1000	3	3	3	2	2

亡细胞Annexin-V高染而PI低染, 分布在图的右下象限(RL); 晚期凋亡或机械损伤细胞Annexin-V和PI均高染, 分布在图的右上象限(RU)。总凋亡率是早期凋亡细胞百分数(RL)和晚期凋亡细胞百分数(RU)的总和。从图3中可看出, 细胞群主要以正常细胞和凋亡细胞为主。由表4可见, 只有1000 μg/mL组总凋亡率显著增加, 与空白对照组有统计学差异($P<0.01$), 说明磷镁晶须浓度在50、200、500 μg/mL时具有良好的生物相容性。

研究表明[34, 35], Mg^{2+}具有良好的生物相容性。吕一鸣等[36]发现, Mg^{2+}浓度达到80 mmol/L才会诱导成骨细胞的凋亡。这个数值高于本实验选用晶须的浓度范围。这表明, 本文实验中1000 μg/mL晶须组出现凋亡增多可能并非由Mg^{2+}引起。但是为了证实这种假设, 需要进一步增加同浓度镁离子的对照试验。除了Mg外, P是新型磷镁晶须的另一主要组成元素。研究表明[37], 无机磷(inorganic phosphate, Pi)离子具有诱导软骨细胞凋亡的能力。Z. Meleti等[38]研究了Pi对成骨细胞凋亡的影响, 发现Pi能够降低成骨细胞活性, 且具有时间和浓度依赖性。他们用5 mmol/L的Pi处理成骨细胞48 h后, 活细胞数量减少25%。这也解释了本文磷镁晶须浓度在1000 μg/mL时凋亡率显著高于其它各组。其原因是, 磷镁晶须浓度的提高也使培养液中Pi的浓度提高, 促进了细胞的凋亡。其原理是, Pi影响了细胞线粒体膜电位, 改变了线粒体膜的通透性而诱导了

chinaXiv:202303.10704v1

ChinaXiv合作期刊

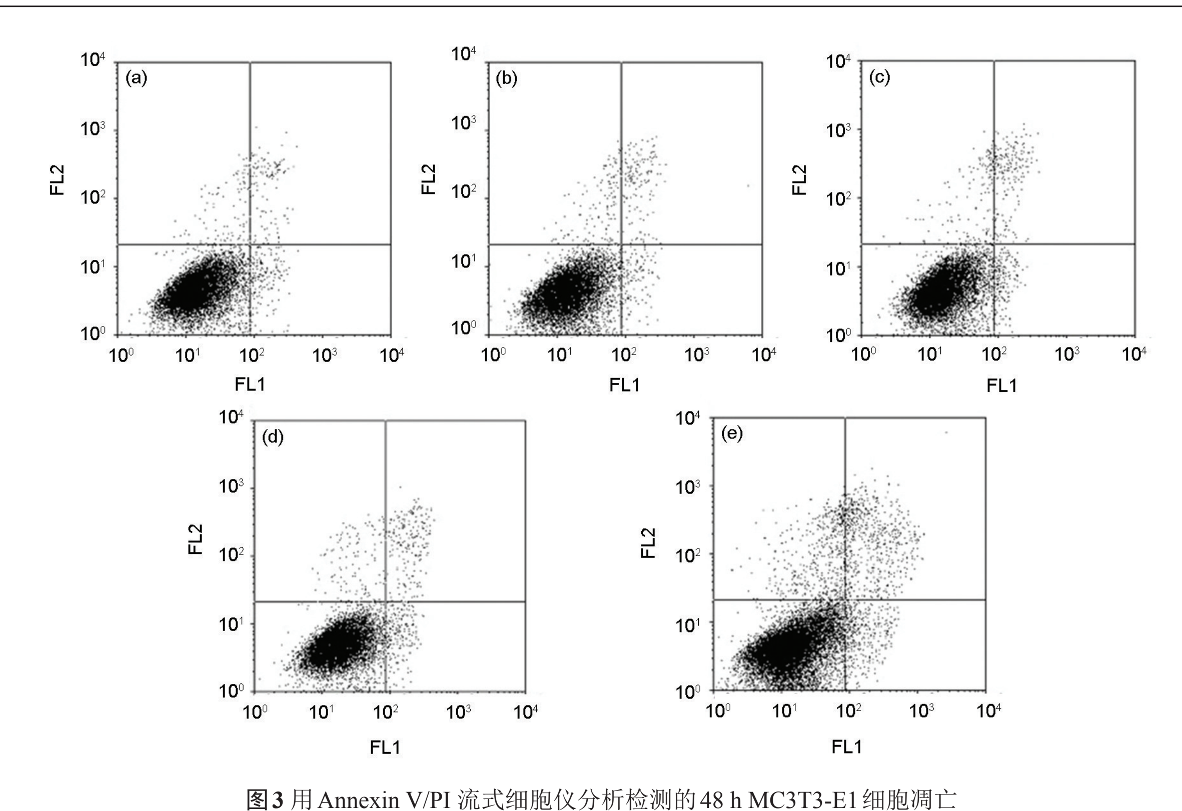


图3 用Annexin V/PI流式细胞仪分析检测的48 h MC3T3-E1细胞凋亡

Fig.3 MC3T3-E1 cell apoptosis detected by Annexin V/PI with flow cytometry after 48 h (a) Blank group; (b) 50 μg/mL phosphorus-magnesium whisker; (c) 200 μg/mL phosphorus-magnesium whisker; (d) 500 μg/mL phosphorus-magnesium whisker; (e) 1000 μg/mL phosphorus-magnesium whisker

表4 各组细胞培养48 h后流式细胞仪检测的凋亡率

Table 4 Apoptosis results measured by flow cytometry after 48 h

Groups (μg/mL)	Cell apoptosis rate	P
50	3.59±0.51	0.315*
200	3.62±0.60	0.286*
500	4.05±0.81	0.070*
1000	9.69±0.48	0.000*
Blank	3.08±0.29	—

Notes: *the P value compared with the blank group

成骨细胞的凋亡[39]。

2.4 新型磷镁晶须的抗菌性

经共培养后，用平板活菌计数法检测新型磷镁晶须对E.coli和S.aureus的杀菌性能。这两种菌分别属于革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌，是最常见和具有代表性的致病菌种之一。磷镁晶须在与E.coli和S.aureus作用48 h后，不同晶须混悬菌液的pH值以及杀菌率列于表5。可以看出，当浓度小于等于1000 μg/mL时对两种细菌的杀菌率随着晶须浓度的提高而提高，表明磷镁晶须的杀菌作用具有浓度依赖性。当晶须浓度在50 μg/mL时，对两种细菌的杀菌率就均高于80%；晶须浓度500 μg/mL时，对E.coli和S.aureus的杀菌率就分别达到96.8%和99.9%以上；其浓度达到1000 μg/mL时，对E.coli和S.aureus的有效抗菌率均高达99.9%以上，表现出良好的广谱抗菌性。这些结果表明，该新型磷镁晶须浓度在500 μg/mL及其以上具有有效的抗菌性能。另外，实验结果也表明，磷镁晶须对S.aureus和E.coli的抗菌效能有所不同。革兰氏阴性菌的细胞壁主要由磷脂、脂多糖和蛋白构成，而革兰氏阳性菌的细胞壁主要是由脂多糖构成[39]。这可能是导致晶须对两种细菌杀菌率不同的原因。

从表5还可看出，随着磷镁晶须浓度的提高晶须菌液的pH值也增高，说明晶须在溶液中降解并调控菌液pH值趋向碱性，这与表1晶须混悬细胞培养液的pH值变化趋势结果相符。其原因是，材料浸于菌液时材料表面与菌液中的水发生一系列的化学反应，材料中的Mg与水中OH^-结合形成了$Mg(OH)_2$。Duane等[29]发现，在细菌培养基中镁金属与水的氢氧根结合形成氢氧化镁并释放氢气。随着培养基中镁离子的增多pH值随之增高，有效抑制了金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和铜绿单胞菌的生长。李向阳等[40]研究表明，大肠杆菌最适宜生长的pH值为7.79，当pH值在5.35−9.72范围外时大肠杆

chinaXiv:202303.10704v1

ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10704v1

菌将不能生长。多项研究结果证明, 具有调控微环境pH为碱性的生物材料具有抗菌效能[41-43]。45S5玻璃陶瓷的pH值随浓度的增大而增高, 且其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和表皮球菌的杀伤效能均增强[43]。这与本文实验结果相符, 证明调控微环境pH值为碱性是磷镁晶须具有抗菌效能的重要因素之一。

菌液在培养基上培养24 h后的细菌生长情况, 如图4所示, 可见经磷镁晶须作用48 h后E.coli和S.aureus菌落数量变化情况。可以看出, 晶须浓度50 μg/mL时两种细菌菌落就已大幅减少, 浓度1000 μg/mL时的菌落甚至在肉眼下看不到。这进一步地说明该晶须有很好的杀菌效能, 且其杀菌能力具有浓度依赖性。还有研究表明[43], 针状的玻璃陶瓷碎屑可以破坏细胞结构起到杀死细菌的作用。如图1所示, 磷镁晶须具有极大的长径比和尖端极小的微纳米尺寸横截面积, 其类似针状尖端也可能是通过刺穿作用破坏细菌结构、杀死细菌。纳米尺寸的尖端可能具有特殊的表面效应和高氧化活性, 能破坏细菌的细胞壁杀死细菌细胞并可分解细菌分泌的毒素。

这种新型磷镁晶须可能的抗菌机制包括: 一方面, 磷镁晶须降解调控细菌生长微环境pH值为碱性; 另一方面, 磷镁晶须尖端破坏细菌的细胞壁。磷

表5 4组浓度的磷镁晶须对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的杀菌率(n=5)

Table 5 Antibacterial rate against E.coli and S.aureus treated with four different concentrations of phosphorus-magnesium whisker (n=5)

Group (μg/mL)	E.coli		S.aureus	
	pH	Sterilizing rate	pH	Sterilizing rate
50	8.86±0.14	82.78%	9.37±0.13	80.13%
200	9.08±0.10	86.76%	9.62±0.09	96.53%
500	9.23±0.17	96.84%	9.86±0.12	99.93%
1000	9.57±0.19	99.96%	10.23±0.25	99.99%
Blank	7.19±0.19	—	7.38±0.15	—

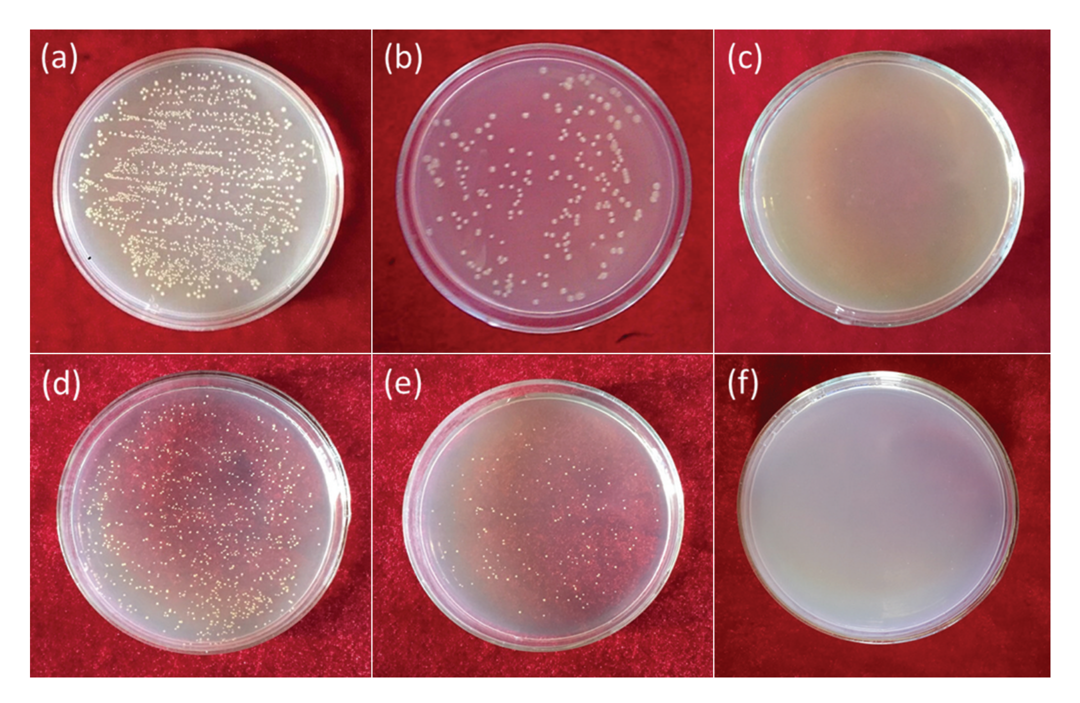


图4 各组磷镁晶须对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌作用效果的照片

Fig.4 Antibacterial effect of phosphorus-magnesium whisker against E.coli and S.aureus (a) Blank group (E. coli); (b) treated with 50 μg/mL whisker (E.coli); (c) treated with 1000 μg/mL whisker (E.coli); (d) Blank group (S.aureus); (e) treated with 50 μg/mL whisker (S.aureus); (f) treated with 1000 μg/mL whisker (S.aureus)

ChinaXiv合作期刊

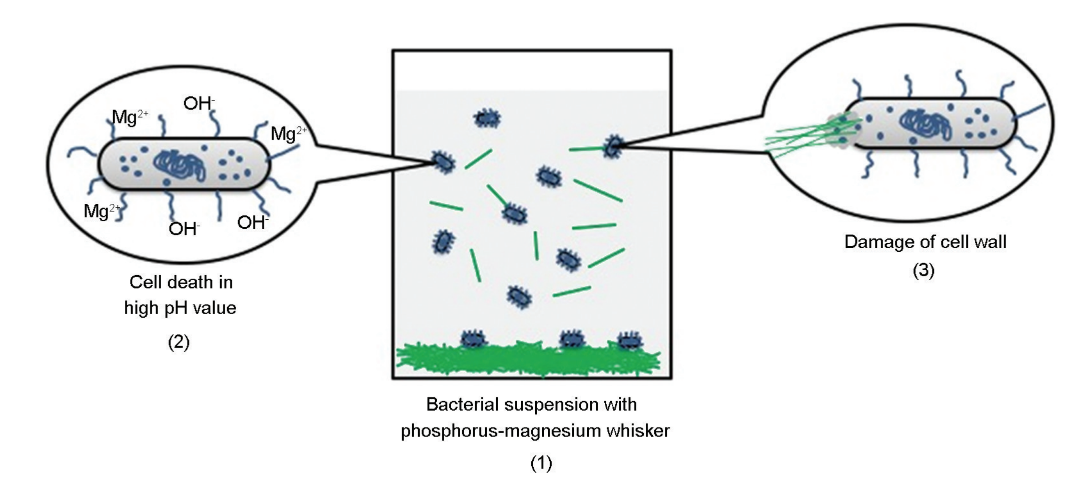


图5 磷镁晶须杀菌过程的示意图

Fig.5 A schematic illustration of the bactericidal process of phosphorus-magnesium whisker

chinaXiv:202303.10704v1

镁晶抗菌过程的示意图, 如图5所示。首先, 磷镁晶须与菌液混合后释放Mg^{2+}并提高了菌液的pH值, 从而杀死细菌。其次, 磷镁晶须的尖端通过刺穿作用或纳米表面效应和高氧化活性破坏细菌细胞壁, 引起细菌死亡。

3 结　论

新型磷镁晶须材料的细胞相容性随着晶须浓度的提高而降低, 晶须浓度小于等于500 μg/mL 时具有较好的成骨细胞相容性, 当晶须浓度为50 μg/mL和200 μg/mL 时对成骨细胞几乎无影响。该晶须浓度为500 μg/mL 时对S.aureus 和 E.coli 的杀菌率分别达到99.93％和96.84%, 表明其抗菌性能优异。

参 考 文 献

1 G. Y. Liu, S. Tang, D. Li, J. Hu, Self-adjustment of calcium phosphate coating on micro-arc oxidized magnesium and its influence on the corrosion behaviour in simulated body fluids, Corros. Sci., **79**(3), 206(2014)

2 G. L. Converse, Y. Weimin, R. K. Roeder, Processing and tensile properties of hydroxyapatite-whisker-reinforced polyetheretherketone, Biomaterials, **28**(6), 927(2007)

3 H. H. K. Xua, J. B. Quinn, D. T. Smith, J. M. Antonucci, G. E. Schumacher, F. C. Eichmiller, Dental resin composites containing silica-fused whiskers effects of whisker-to-silica ration on fracture toughness and indentation properties, Biomaterials, **23**(3), 735 (2002)

4 M. B. Nair, J. D. Kretlow, A. G. Mikos, F. K. Kasper, Infection and tissue engineering in segmental bone defects-a mini review, Curr. Opin. Biotechnol., **22**(5), 721(2011)

5 T. J. Ryan, Infection following soft tissue injury: its role in wound healing, Curr. Opin. Infect. Dis., **20**(2), 124(2007)

6 E. M. Hetrick, M. H. Schoenfisch, Reducing implant-related infections: active release strategies, Chem. Soc. Rev., **35**(9), 780(2006)

7 M. Braddock, P. Houston, C. Campbell, P. Ashcroft, Born again bone: Tissue engineering for bone repair, News in Physiology Sciences, **16**(5), 208(2001)

8 H. Hu, G. Xu, Q. Zan, J. Liu, R. Liu, Z. Shen, X. Ye, In situ formation of nano-hydroxyapatite whisker reinfoced porous β-TCP scaffolds, Microelectronic Engineering, **98**, 566(2012)

9 R. J. Kane, H. E. Weiss-Bilka, M. J. Meagher, Y. Liu, J. A. Gargac, G. L. Niebur, D. R. Wagner, R. K. Roeder, Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties, Acta Biomaterialia, **17**(6), 16(2015)

10 F. A. Müller, U. Gbureck, T. Kasuga, Y. Mizutani, J. E. Barralet, U. Lohbauer, Whisker-reinforced calcium phosphate cements, J. Am. Ceram. Soc., **90**(11), 3694(2007)

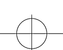
11 S. Bose, A.Banerjee, S. Dasgupta, A. Bandyopadhyay, Synthesis, processing, mechanical, and biological property characterization of hydroxyapatite whisker-reinforced hydroxyapatite composites, J. Am. Ceram. Soc., **92**(2), 323(2009)

12 SHI Lei, SONG Aiyang, GONG Haihuan, FENG Dan, JIN Jie, ZHU Song, Chinese Journal of Practical Stomatology, **8**(3), 180 (2015)
(石　磊, 宋艾阳, 宫海环, 冯　丹, 金　杰, 朱　松, 纳米复合树脂研究进展, 中国实用口腔科杂志, **8**(3), 180(2015))

13 F. Liu, B. Sun, X. Jiang, S. S. Aldeyab, Q. Zhang, M. Zhu, Mechanical properties of dental resin/composite containing urchin-like hydroxyapatite, Dent. Mater., **30**(12), 1358(2014)

14 WANG Rong, ZHANG Wenyun, JIA Anqi, SUN Linhui, Effects of different kinds and usage amounts of whisker fillers on mechanical properties of resin composite, Journal of Oral Science Research, **23** (4), 365(2007)
(王　蓉, 张文云, 贾　安, 孙林辉, 不同晶须及晶须用量对复合树脂力学性能的影响, 口腔医学研究, **23**(4), 365(2007))

15 NIU Lina, CHEN Jihua, FANG Ming, YANG Jucai, JIAO Kai, Effects of tetrapod-like zinc oxide whiskers incorporation on antibacterial activity of composite resin, Chin. J. Stomatol., **44**(4), 240 (2009)
(牛丽娜, 陈吉华, 方　明, 杨聚才, 焦　凯, 四针状氧化锌晶须对复



ChinaXiv合作期刊

chinaXiv:202303.10704v1

合树脂抗菌性能的影响, 中华口腔医学杂志, **44**(4), 240(2009))

16 S. N. Garcia, L Gutierrez, A McNulty, Real-time cellular analysis as a novel approach for in vitro cytotoxicity testing of medical device extracts, J. Biomed. Mater., **101**(7), 2097(2013)

17 J. Xia, C. Yang, D. Xu, D. Sun, L. Nan, Z. Sun, Q. Li, T. Gu, K. Yang, Laboratory investigation of the microbiologically influenced corrosion (MIC) resistance of a novel Cu-bearing 2205 duplex stainless steel in the presence of an aerobic marine Pseudomonas aeruginosa biofilm, Biofouling, **31**(6), 481(2015)

18 LI Wu, JIN Zhiliang, ZHANG Zhihong, Application and synthesis of inorganic whisker materials, Progress in Chemistry, **15**(4), 264 (2003)
(李　武, 靳治良, 张志宏, 无机晶须材料的合成与应用, 化学进展, **15**(4), 264(2003))

19 XU Zhaoyu, Research progress of whisker and its application, Technology & Development of Chemical Industry, **34**(2), 11(2005)
(徐兆瑜, 晶须的研究和应用新进展, 化工技术与开发, **34**(2), 11 (2005))

20 C. J. Holmes, D Faict, Peritoneal dialysis solution biocompatibility: Definitions and evaluation strategies, Kidney. Int., **64**(88), S50 (2003)

21 N. Ke, X. Wang, X. Xu, Y. A. Abassi, The xCELLigence system for real-time and label-free monitoring of cell viability, Methods Mol. Biol., **740**, 33(2011)

22 K. Solly, X. Wang, X. Xu, B. Strulovici, W Zheng, Application of real- time cell electronic sensing (RT-CES) technology to cell-based assays, Assay Drug Dev. Technol., **2**(4), 363(2004)

23 A. Konjhodzic, S. Jakupovic, L. Hasic-Brankovic, A.Vukovic, Evaluation of Biocompatibility of Root Canal Sealers on L929 Fibroblasts with Multiscan EX Spectrophotometer, Acta Informatica Medica, **23**(3), 135(2015)

24 J. Gu, R. Sun, S. Shen, Z. Yu, The influence of TLR4 agonist lipopolysaccharides on hepatocellular carcinoma cells and the feasibility of its application in treating liver cancer, Onco Targets and Therapy, **8**, 2215(2015)

25 ZHAO Xin, CAO Yang, YIN Zhun, ZHANG Guangping, REN Yibin, ZHAN Desong, In vitro biocompatibility of Co-Cr alloys with different content of copper, Chinese Journal of Materials Rearch, **29**(7), 628(2015)
(赵　昕, 曹　阳, 印　准, 张光平, 任伊宾, 战德松, 不同铜含量钴铬合金的体外生物相容性, 材料研究学报, **29**(7), 628(2015))

26 J. Z. Xing, L. Zhu, J. A. Jackson, S. Gabos, X. J. Sun, X. B. Wang, X. Xu, Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors, Chem. Res. Toxicol., **18**(2), 154(2005)

27 J. J. Quereda, L. Martínez-Alarcón, L. Mendoça, M. J. J. M. Majado, Herrero-Medrano, F.J. Pallarés, A. Ríos, P. Ramírez, A. Muñoz, G. Ramis, Validation of xCELLigence real-time cell analyzer to assess compatibility in xenotransplantation with pig-to-baboon model, Trans- plant Proc., **42**(8), 3239(2010)

28 J. T. Irelan, M. J. Wu, J. Morgan, K. Ning, B. Xi, X. Wang, X. Xu, Y. A. Abasi, Rapid and quantitative assessment of cell quality, identity, and functionality for cell-based assays using real-time cellular analysis, J. Biomol. Screen., **16**(3), 313(2011)

29 DA. Robinson, RW. Griffith, D. Shechtman, RB. Evans, MG. Conzemius, In vitro antibacterial properties of magnesium metal against Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus, Acta Biomater, **6**(5), 1869(2010)

30 B. S. Kim, J. S. Kim, Y. M. Park, B. Y. Choi, J. Lee, Mg ion implantation on SLA-treated titanium surface and its effects on the behavior of mesenchymal stem cell, Materials Science and Enginerring: C, **33**(3), 1554(2013)

31 G. Wang, J. Li, W. Zhang, L. Xu, H. Pan, J. Wen, Q. Wu, W. She, T. Jiao, X. Liu, X. Jiang, Magnesium ion implantation on a micro/nanostructured titanium surface promotes its bioactivity and osteogenic differentiation function, Int. J. Nanomedicine., **9**(1), 2387 (2014)

32 Y. T. Sul, C. Johansson, A. Wennerberg, L. R. Cho, B. S. Chang, T. Albrektsson, Optimum surface properties of oxidized implants for reinforcement of osseointegration: surface chemistry, oxide thickness, porosity, roughness, and crystal structure, Int. J. Oral Maxillofac. Implants, **20**(3), 349(2005)

33 WANG Jian, MA Xiangyu, FENG Yafei, MA Tiancheng, LEI Wei, WANG Lin, Promotive effect of magnesium ions on viability and differentiation of osteoblasts and underlying mechanism, Progress in Modern Biomedicine, **15**(15), 2836(2015)
(王　健, 马翔宇, 冯亚非, 马田成, 雷　伟, 王　林, 镁离子对成骨细胞活力和分化的促进作用及其机制研究, 现代生物医学进展, **15**(15), 2836(2015))

34 YUAN Guangyin, ZHANG Xiaobo, NIU Jialin, TAO Hairong, CHEN Daoyun, HE Yaohua, JIANG Yao, DING Wenjiang, Research progress of new type of degradable biomedical magnesium alloys JDBM, The Chinese Journal of Nonferrous Metals, **21**(10), 2476(2011)
(袁广银, 章晓波, 牛佳林, 陶海荣, 陈道运, 何耀华, 蒋　垚, 丁文江, 新型可降解生物医用镁合金JDBM的研究进展, 中国有色金属学报, **21**(10), 2476(2011))

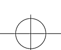
35 YUAN Guangyin, ZHANG Jia, DING Wenjiang, Research Progress of Mg-based alloys as degradable biomedical materials, Materials China, **30**(2), 44(2011)
(袁广银, 张　佳, 丁文江, 可降解医用镁基生物材料的研究进展, 中国材料进展, **30**(2), 44(2011))

36 LÜ Yiming, HAN Pei, JI Weiping, CHAI Yimin, Effects of concentrations of magnesium ions on behavior of fibroblasts and osteoblasts, Chin. J. Orthop. Trauma., **15**(12), 1065(2013)
(吕一鸣, 韩　培, 嵇伟平, 柴益民, 不同浓度镁离子对成纤维细胞和成骨细胞影响的体外试验研究, 中华创伤骨科杂志, **15** (12), 1065(2013))

37 K. Mansfield, R. Rajpurohit, I. M. Shapiro, Extracellular phosphate ions cause apoptosis of terminally differentiated epiphyseal chondrocytes, Cell Physiol., **179**(3), 276(1999)

38 Z. Meleti, I. M. Shapiro, C. S. Adams, Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture, Bone, **27**(3), 359 (2000)

39 J. Rundegren, T. Sjodin, L. Petersson, E. Hansson, Jonsson, Del-



ChinaXiv合作期刊

mopinol interactions with cell walls of gram-negative and gram-positive oral bacteria, Oral Microbiology & Immunology, **10**(2), 102(1995)

40 LI Xiangyang, SHAO Weihua, DIAO Enjie, ZHANG Honglin, Inhibition study on E. coli by temperature, pH and natural drug with microcalorimetric method, Food Science, **28**(06), 252(2007)
(李向阳, 邵卫华, 刁恩杰, 张洪林, 温度、pH、药物对大肠杆菌抑制作用的量热法研究, 食品科学, **28**(06), 252(2007))

41 P. Stoor, E. Soderling, J. I. Salonen, Antibacterial effects of a bioactive glass paste on oral microorganisms, Acta Odontol. Scand., **56**(3), 161(1998)

42 I. Allan, H. Newman, M. Wilson, Antibacterial activity of particulate bioglass against supra- and subgingival bacteria, Biomaterials, **22**(12), 1683(2001)

43 S. Hu, J. Chang, M. Liu, C. Ning, Study on antibacterial effect of 45S5 Bioglass, J. Mater. Sci. Mater. Med., **20**(1), 281(2009)

chinaXiv:202303.10704v1

